

1/34/8 (Item 4 from file: 351)

003706377

WPI Acc No: 1983-702559/198327

**NAD(p) dependent cholesterol dehydrogenase prepn. - by
cultiVating Nocardia Alcaligenes or Proteus microorganism aerobically and
recovering prod.**

Patent Assignee: AMANO PHARM KK (AMAN)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 58089183	A	19830527				198327 B
JP 90018064	B	19900424	JP 81186183	A	19811119	199020

Priority Applications (No Type Date): JP 81186183 A 19811119

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58089183	A		9		

Abstract (Basic): JP 58089183 A

<http://www.dialogweb.com/cgi/dwclient?req=1143736480348>

3/30/2006

Prodn. of NAD(P) dependent cholesterol dehydrogenase (NAD(P)-CDH) comprises cultivating a microorganism of Nocardia (specific: Nocardia sp.No.Ch 2-1, FERM-P 6217), Alcaligenes (Alc.sp.No.4, FERM-P 6216) or Proteus (Proteus vulgaris IAM 1025) which grows under aerobic conditions, and recovering NAD(P)-CDH from the culture broth.

The microorganism may be incubated in a medium contg. nitrogen source (peptone, yeast extract, (NH₄)₂SO₄), carbon source (glucose, glycerol) and mineral. Addn. of cholesterol to the medium increases the yield of NAD(P)-CDH. In recovering NAD(P)-CDH, the cultured broth or organism extract is treated by salting-out or pptn. with Me₂CO and EtOH. The resulting crude enzyme may be purified by ion-exchange chromatography or molecular sieve chromatography.

NAD(P)-CDH is useful as a reagent used in quantitative analysis of cholesterol..For example, the reagent consists of 0.1-10 unit DAD(P)-CDH, 10-100 mM NAD(P), less than 1.0% Triton 100, and 0.1-10 unit cholesterol esterase.

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12N-009/04; C12R-001/05

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2006 Thomson Derwent. All rights reserved.

SOURCE: (C) WPI / DERWENT

XP 2044527

AN : 83-702559 [27]

MC : B04-B02C2 B12-K04 D05-C03

PN : JP58089183 A 830527 DW8327 009pp
 - JP2018064B B 900424 DW9020 000pp

PR : JP810186183 811119

PA : (AMAN) AMANO PHARM KK

DC : B04 D16

IC : C12N9/04 ;C12R1/05

TI : NAD(p) dependent cholesterol dehydrogenase prepn. - by cultivating Nocardia Alcaligenes or Proteus microorganism aerobically and recovering prod.

AB : J58089183 Prodn. of NAD(P) dependent cholesterol dehydrogenase (NAD(P)-CDH) comprises cultivating a microorganism of Nocardia (specific: Nocardia sp.No.Ch 2-1, FERM-P 6217), Alcaligenes (Alc.sp.No.4, FERM-P 6216) or Proteus (Proteus vulgaris IAM 1025) which grows under aerobic conditions, and recovering NAD(P)-CDH from the culture broth.

- The microorganism may be incubated in a medium contg. nitrogen source (peptone, yeast extract, (NH₄)₂SO₄), carbon source (glucose, glycerol) and mineral. Addn. of cholesterol to the medium increases the yield of NAD(P)-CDH. In recovering NAD(P)-CDH, the cultured broth or organism extract is treated by salting-out or pptn. with Me₂CO and EtOH. The resulting crude enzyme may be purified by ion-exchange chromatography or molecular sieve chromatography.
- NAD(P)-CDH is useful as a reagent used in quantitative analysis of cholesterol. For example, the reagent consists of 0.1-10 unit DAD(P)-CDH, 10-100 mM NAD(P), less than 1.0% Triton 100, and 0.1-10 unit cholesterol esterase.

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—89183

⑪ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号
7236—4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)5月27日

C 12 N 9/04
 //(C 12 N 9/04
 C 12 R 1/365)
 (C 12 N 9/04
 C 12 R 1/05)
 (C 12 N 9/04
 C 12 R 1/37)

発明の数 1
 審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵
 素の製造法

⑯ 発 明 者 秋葉哲典
 岐阜県可児郡可児町愛岐ヶ丘1
 —165

⑰ 特 願 昭56—186183
 ⑱ 出 願 昭56(1981)11月19日

⑲ 出 願 人 天野製薬株式会社
 名古屋市中区錦一丁目2番7号

明 細 書

1. 発明の名称

NAD の依存性コレステロール脱水素酵
 素の製造法

2. 特許請求の範囲

1. 好氣的条件下で生育する微生物を培養し培
 養物からNAD の依存性 コレステロール脱水素
 酵素を採取することを特徴とするNAD の依存
 性コレステロール脱水素酵素の製造法。
2. 好氣的条件下で生育する微生物がノカルジ
 ア属、アルカリゲネス属、プロテウス属のうち
 のいずれかに属する菌株である特許請求の範囲
 第1項記載のNAD の依存性コレステロール脱
 水素酵素の製造法。
3. ノカルジア属に属する菌株がノカルジア
 sp. № Ch 2—1 (Nocardia sp. № Ch 2—1) F
 ERM—P№6217である 特許請求の範囲第2項
 記載のNAD の依存性コレステロール脱水素酵
 素の製造法。
4. アルカリゲネス属に属する菌株がアルカリ

ゲネス sp. №4 (Alcaligenes sp. №4) FER
 M—P№6216である特許請求の範囲第2項記載
 のNAD の依存性コレステロール脱水素酵素の
 製造法。

5. プロテウス属に属する菌株がプロテウス・
 ブルガリス IAM1025 (Proteus vulgaris I
 AM1025)である特許請求の範囲第2項記載の
 NAD の依存性コレステロール脱水素酵素の製
 造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、NAD の依存性コレステロール脱水
 素酵素 (Cholesterol dehydrogenase: 以下「N
 AD の—CDH」と略す) に関する。さらに詳し
 く説明すると、微生物を好氣的条件下で培養し、
 その菌体もしくは培養液からNAD の—CDHを
 採取する方法に関する。

本発明方法により得られたNAD の—CDHは、
 コレステロールの定量法およびコレステロールの
 定量用試薬として有用である。ここでいうNAD
 の—CDHとは、補酵素としてNAD (ニコチン

アミドアデニン、ジヌクレオチド)、NADP (ニコチンアミドアデニン、ジヌクレオチドリ
ン酸)を要求し、電子供与体(コレステロール)
から水素をうばい、電子受容体(NAD又はNA
DP)に付加する反応を触媒する酵素をいう。
従来好気性微生物が、コレステロールオキシダー
ゼ、コレステロールデヒドラターゼを生産するこ
とは既に知られている。また、ノカルジア・エリ
スロポリスがコレステロールの酸化を触媒する酵
素を生産するとの報告(Ann. Clin. Biochem.,
10巻、79項、1973年)がある。この酵素の場
合は、NAD(P)への依存性は認められない。また、
マイコバクテリウム・コレステリカム(J. Biol.
Chem., 206巻、511項、1953年)、プレババ
クテリウム・ステロリカム(特公昭48-1190)
についても同様のことがいえる。さらには、絶対
嫌気性微生物である、オイバクテリウム sp.
ATCC21408がNAD(P)-CDHを生産すると
の報告(特開昭53-56090)もあるが、酵素学
的性質等の記載はほとんどなされていないばかり

本発明者等は、上記反応に適した酵素すなわち、
コレステロールに特異性が高く、NAD(P)依存性
である脱水素酵素を広く自然界に求めたところ、
意外にも好気的条件下に生育する微生物が、著量
のNAD(P)-CDHを生産することを見出した。
その中で、特に優れた菌株として、ノカルジア
sp. Na Ch2-1(Nocardia sp. Na Ch2-1)、ア
ルカリゲネス sp. Na 4 (Alcaligenes sp. Na 4)、
およびプロテウス・ブルガリス IAM1025
Proteus vulgaris IAM1025 が例示される。

次にノカルジア sp. Na Ch2-1およびアルカリ
ゲネス sp. Na 4 の菌学的性質を以下に述べる。

(1) ノカルジア sp. Na Ch2-1(Nocardia sp.
Na Ch2-1)の菌学的性質

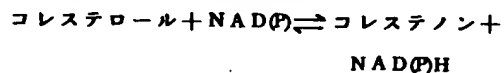
(A) 形態的性質

- 1) 細胞の形および大きさ：培養初期菌糸状
に生育し分岐を生じる。その後、不規
則な分断が生じ細胞は桿菌状となる。
大きさは $0.8 \sim 1.0 \mu \times 1.5 \sim 4.0 \mu$
位である。気菌糸を形成せず胞子のう

か、NAD(P)依存性の記載があるにもかかわらず、
NAD(P)の存在なしにも反応が進行する例が記載
されている。したがってこの酵素は、本発明でい
うところのNAD(P)依存性脱水素酵素とはいえない。

従来酵素によるコレステロールの定量は、コレ
ステロールオキシダーゼを使用する方法が広く用
いられているが、発色系に導くためにパーオキシ
ダーゼ等が必要であり、操作が繁雑である。しか
も血中のビリルビン、アスコルビン酸等により影
響を受け、これにより誤差が生じやすいという欠
点を有している。

コレステロールの定量において、NAD(P)の存
在なしには反応が進行しないNAD(P)-CDHを
用い、下記反応式に示される反応により生ずるN
AD(P)Hを直接光度計で測定できれば、操作が簡
単であり、前記のコレステロールオキシダーゼを
用いる方法の種々の問題も解決される。



胞子も形成しない。

- 2) グラム染色性：陽性
- 3) 抗酸性：陽性
- 4) 運動性：無し

(B) 化学的組成分析

細胞壁中に meso-ジアノビメリン酸、ア
ラビノース、ガラクトースが含まれ、^{トリ}ジ
アミノビメリン酸、グリシンは含まない。

(C) 各培地における生育状態

- 1) 肉汁寒天平板培地：30℃で4日培養後、
直径0.5～1.0mmの円形コロニーを
形成する。周辺は全縁もしくは波状で
ある。表面は平滑で半球状であり、中
心部が凸状に隆起する場合もある。色
調は薄いクリーム色で不透明である。
培地中に色素は出さない。
- 2) シュークロース硝酸塩寒天培地
生育中程度で集落の色は白色ないし薄ク
リーム色である。水溶性色素は出さない。
- 3) グルコース、アスパラギン寒天培地

生育中程度で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

4) グリセリン、アスパラギン寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

5) スターチ無機塩寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

6) チロシン寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

7) 栄養寒天培地

生育良好で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

8) イースト麦芽寒天培地

生育良好で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

9) オートミール寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

て陽性

16) ペニシリン耐性試験：耐性

17) 酸素に対する態度：好気性

18) 無機窒素源の利用：アンモニウム塩、硝酸塩共に利用する。

19) NaCl 生育範囲：0～6%で生育する。7%で生育しない。

20) 各種炭素源の同化性（ブドウ糖、ゴドリーブ寒天培地）

D-グルコース、D-フラクトース、マンノース、グリセリン、トレハロースを同化する。 L -アラビノース、D-キシロース、サッカロース、イノシット、 L -ラムノース、ラフィノース、D-ガラクトース、D-マンニット、マルトース、ソルビットを同化しない。

21) 各種糖から酸の生成

D-グルコース、マンノース、D-フラクトース、トレハロース、グリセリンから酸を生成する。 L -アラビノース、D-キシロース、D-ガラクトース、

(1) 生理的性質

1) 生育温度：15℃～43℃で生育する。

10℃、45℃で生育しない。

最適温度は30～35℃である。

2) 硝酸塩還元性：陽性

3) カタラーゼ：陽性

4) オキシダーゼ：陰性

5) ウレアーゼ：陽性

6) デンプン加水分解：陰性

7) ゼラチン液化：陰性

8) チロシン加水分解：陰性

9) カゼイン加水分解：陰性

10) キサンチン加水分解：陰性

11) DNAの分解：陰性

12) リトマスミルク：アルカリ性、ペプトン化、凝固共にしない。

13) メラニン様色素の生成：無し

14) エスクリン加水分解：陽性

15) Tween 20、40、60、80加水分解：すべて

ス、D-キシロース、D-ガラクトース、マルトース、サッカロース、ラクトース、D-ソルビット、D-マンニット、イノシット、デンプンから酸を生成しない。

以上の菌学的性質を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版を参考に検討した結果、細胞壁中に meso-ジアミノピメリン酸、アラビノース、ガラクトースを含み、 L -ジアミノピメリン酸、グリシンが含まれないこと、好気性で菌糸状によく生育し、後に分断して菌状となること、抗酸性であること、胞子のう胞子および気菌糸を着生しないこと等から本菌は *Nocardia* に属する菌である。

よって本菌は、本発明者らがノカルジア sp. No Ch2-1 (*Nocardia* sp. No Ch2-1) と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に菌寄第6217号 (FERM-PNo6217) とて寄託されている。

(2) アルカリゲネス sp. No4 (*Alcaligenes* sp. No4) の菌学的性質

(A) 形 態

- 1) 細胞の形および大きさ: $0.4 \sim 0.6 \mu \times 0.8 \sim 1.2 \mu$ の 菌である。
- 2) 細胞の多形性の有無: 多形性は認められない。
- 3) 運動性の有無: 周鞭毛を有し運動する。
- 4) 胞子の有無: 胞子は形成しない。
- 5) グラム染色性: 陰性
- 6) 抗酸性: 陰性

(B) 各培地における生育状態

1) 肉汁寒天平面培養

円形ローニーで表面は平滑、半レンズ状の隆起、全縁状で薄クリーム色、半透明、光沢あり

2) 肉汁寒天斜面培養

生育中程度、糸状に生育、薄クリーム色で半透明

3) 肉汁液体培養

菌膜をつくらない、やや濁り沈も少しある。

13) カタラーゼ: 陽性

14) 生育範囲 PH: PH 5.0 ~ 10.0 で生育する。温度: $5^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ で生育する。 42°C で生育しない。

15) 酸素に対する態度: 好気性

16) OF テスト (Hugh-Leifson 法): フラクトースから好氣的に酸を生成する。

17) 糖類から酸およびガスの生成の有無

Ayers, Rupp and Johnson 培地でフラクトースとグリセリンから酸を生成するかガスは生成しない。
アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース、ガラクトース、麦芽糖、シ、糖、乳糖、トレハロース、ソルビット、マンニット、イノシット、デンプンからは酸もガスも生成しない。

18) 独立栄養的生育: 水素ガス、炭酸ガス、酸素ガスを含有する気体中で生育しない。

19) Tween 80 の分解性: 陽性

4) 肉汁ゼラチン穿刺培養: ゼラチンは液化しない。

5) リトマスミルク培養: アルカリ性になるがペプトン化しない、凝固しない。

(C) 生理的性質

1) 硝酸塩の還元: 陽性

2) 脱窒反応: 陰性

3) MR テスト: 陰性

4) VR テスト: 陰性

5) インドールの生成: 陰性

6) 硫化水素の生成: 弱陽性

7) デンプン加水分解: 陰性

8) クエン酸塩の利用: Koser の培地と Christensen の培地で共に利用する。

9) 無機窒素源の利用: 硝酸塩およびアンモニウム塩を利用する。

10) 色素の生成: 水溶性色素を生成しない。

11) ウレアーゼ: 陽性

12) オキシダーゼ: 陽性

20) 質化性: D-フラクトース、^L-フェニルアラニン、レブリン酸カルシウム、^L-スレオニンを質化する。マンノース、マルトース、マンニット、ベタインを質化しない。

以上の菌学的諸性質から Bergey's manual of Determinative Bacteriology (第8版) の記載に照合して検討すると短桿菌で周鞭毛により運動すること、グラム陰性、好気性であること、栄養要求性はなく、アンモニウム塩、硝酸塩を利用すること、カゼインおよびゼラチンを分解しないこと、オキシダーゼ陽性であること等から Alcaligenes 属に分類される。

種については、~~文献④⑤を参考に検討したところ~~
~~Alcaligenes eutrophus, A. paradoxus, A. ruhlandii~~
~~および A. latus~~ ^{A. faecalis} とは主に独立栄養的生育の点で異なる。また ~~A. paradoxus~~ ^{A. faecalis} とは主に 42°C における生育、D-フラクトースの質化性で、*A. agvarinus* とは、主にデンプンの分解性、マルトースの質化性で、*A. pacificus* とは、主にスレオニン、ベ

タインの質化性で、*A. cupidus* とは、主にオキニダーゼおよびマンニット、マンノースの質化性で、*A. venustus* とは、主にレブリン酸塩、スレオニン、ベタインの質化性で、*A. aestus* とは、主にマンニット、スレオニン、フェニルアラニンの質化性で異なる。よって本菌をアルカリゲネス *sp.* №4 (*Alcaligenes sp.* №4) と命名し工業技術院微生物工業技術研究所に菌寄第6216号 (FERM-P №6216) として寄託されている。

次にこれらの菌を用いて NAD(P)-CDH を製造する方法について詳述する。これらの菌はいずれも構成的に NAD(P)-CDH を生産する能力を有し、通常のペプトン、酵母エキス、又は硫酸アンモニウム等のチッソ源及びグルコース、グリセロール等の炭素源、その他無機塩等を含有する培地でも NAD(P)-CDH を生産するが、コレステロールを培地に添加することによりさらに多量に NAD(P)-CDH を生産する。この際コレステロールの添加は、培養開始時あるいは途中からのいずれでもよい。また、その他培養条件に関しては、

通常行なわれる範囲で実施できる。これらの菌により生産された NAD(P)-CDH は、菌体のみならず、培養液中にも蓄積され、その何れからでも酵素を回収することができる。これらの培養濾液又は菌体抽出液を硫酸アンモニウム等による塩析又は、アセトン、エタノール等の溶剤沈殿して得た粗酵素は、そのままコレステロールの定量に使用するか、あるいは更に精製して使用することもできる。例えば精製については、イオン交換クロストグラフィー、分子篩クロストグラフィー等公知の方法により可能である。

ここで得られる NAD(P)-CDH は、コレステロール含有物質中のコレステロール定量等に有利に使用できる。

本発明に使用する NAD(P)-CDH の活性測定法を以下に示す。

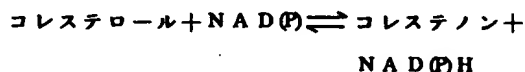
NAD(P)-CDH の酵素活性は、コレステロールと NAD(P) を基質として反応した場合の NAD(P)H の生成量を、340nm における吸光度の増加として、分光光度計で測定し算出する。すなわち、

0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (PH 8.6) 2.65 ml、28 mM MNAD 溶液 0.1 ml、(8% トリトン X-100 溶液 0.15 ml)、1% コレステロール溶液 0.05 ml 及び NAD(P)-CDH 水溶液 0.05 ml を混合し、30°C で反応させ、反応開始後 1 分間の 340nm における吸光度の増加を測定する。

対照として上記組成でコレステロールの代りに水を用い同様の操作を行ない、対照液の 340nm における吸光度の増加を試験液のそれから差し引く。得られた値から NAD(P)H の生成量を求め、これより試料中の NAD(P)-CDH 活性を算出する。

酵素活性の表示は、PH 8.6、30°C の条件下で 1 分間に 1 μ mole の NAD(P)H を生成する酵素を 1 単位とした。

次に本発明に使用する NAD(P)-CDH の作用を示す。



本発明における NAD(P)-CDH は全てこの反

応を触媒する。

以下に本発明に使用する NAD(P)-CDH の一般的性質をノカルジア *sp.* № Ch2-1 (*Nocardia sp.* № Ch2-1) FERM-P6217 およびアルカリゲネス *sp.* №4 (*Alcaligenes sp.* №4) FERM-P6216 の生産するものについて示す。

(1) ノカルジア *sp.* № Ch2-1 (*Nocardia sp.* № Ch2-1) FERM-P6217 の生産する NAD(P)-CDH

1) 至適 PH

第 1 図に 30°C における PH と活性の関係を示した。

2) PH 安定性

第 2 図に 37°C における PH と安定性の関係を示した。

3) 至適温度

第 3 図に PH 8.6 における温度と活性の関係を示した。

4) 熱安定性

第 4 図に PH 7.0 における温度と安定性の

関係を示した。

5) 基質特異性

本 素は、3 β 位に水酸基をもつステロイドに反応し、コレステロールを100とするとスティグマステロール35、 β -シトステロール25、その他デヒドロエピアンドロステロン、エルゴステロール等にわずかに作用する。

6) 補 素

NADを要求する。

(2) アルカリゲネス sp. No. 4 (Alcaligenes sp. No. 4) FERM-P6216の生産するNAD(P)-CDH

1) 至適PH

第5図に30°CにおけるPHと活性の関係を示した。

2) PH安定性

第6図に37°CにおけるPHと安定性の関係を示した。

3) 至適温度

で測定する。また必要に応じて、生成したNAD(P)Hの水素をフェナジンメソサルフェート(PMS)、ジアフ、ラーゼ等により、ホルマザン色素等の発色系に導くことも可能である。さらには、反応系にコレステロールエステラーゼ、界面活性剤及び、安定化剤等の添加も可能である。反応時のPH^{7.6}~~6.6~~〜10の範囲で実施できるが、優れているPH範囲は7〜9である。

次にNAD(P)-CDHによるコレステロール定量用試薬の量的組成についての1例を述べれば、反応系3ml当り、NAD(P)-CDH 0.1〜10単位、NAD(P)-10〜100mM、トリトンX-100 1.0%以下、コレステロールエステラーゼ(ベーリンガー社製) 0.1〜10単位が有利である。しかし本発明はこれらの量的組成に限定されるものではない。本発明の測定法における特別な利点は生成するNAD(P)Hを直接測定できることであり、また完全に定量できることである。

次に試験例及び実施例につき述べる。

試験例

第7図にPH 8.6における温度と活性の関係を示した。

4) 熱安定性

第8図にPH 7.0における温度と安定性の関係を示した。

5) 基質特異性

本 素は3 β 位に水酸基をもつステロイドに反応し、コレステロールを100とすると β -シトステロール36、スティグマステロール20、その他、デヒドロエピアンドロステロン、エルゴステロール等にわずかに作用する。

6) 補 素

NADを要求する。

次に本発明のNAD(P)-CDHを使用したコレステロールの定量について詳述する。

コレステロールを定量する場合、実際には緩衝液、NAD(P)、基質(血清、コレステロール等)及び、NAD(P)-CDHを混合し、一定時間反応し、生成するNAD(P)Hの増加を吸光度340nm

本発明における菌株3種につき、コレステロール5g/l、肉エキス5g/l、酵母エキス0.2g/l、少量の消泡剤の組成よりなる培地(PH 7.2) 100mlを入れた500ml 容瓶ロフラスコに植菌し、30°Cで40時間振盪培養した。培養液50mlを遠心分離(8000rpm 10分間)により集菌し、0.1Mリン酸緩衝液PH 7.0、50mlで洗浄した。

次に同じ緩衝液50mlに菌体を懸濁し、超音波にて菌体を破碎した。この破碎液を遠心分離(10000rpm、10分間)し、清澄液を得た。得られた清澄液のNAD(P)-CDH活性を測定し次の結果を得た。

菌 株	培養液100ml当の活性
<i>Nocardia</i> sp. № Ch2-1 FERM-P№6217	5.4 単位
<i>Alcaligenes</i> sp. № 4 FERM-P№6216	2.3 単位
<i>Proteus vulgaris</i> IAM1025	1.1 単位

実施例 1

Nocardia sp. Ch2-1 FERM-P№6217 をグルコース 5 g/l、肉エキス 5 g/l、酵母エキス 0.2 g/l、少量の消泡剤の組成よりなる培地 (PH 7.2)、200 ml を入れた 500 ml 容坂ロフラスコに植菌し、30°C で 24 時間振盪培養する。この種培養液をコレステロール 5 g/l、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20 ml を入れた 30 ml 容ジャーフーマンターに植菌し、30°C で通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら 40 時間培養した。培養液を遠心分離し、得られた菌体を 0.1 M リン酸緩衝液 PH 7.0 に懸濁し、ガラスゼーズにより菌体を破砕した。この菌体破砕液を遠心分離 (1000 rpm、10 分間) し、清澄な菌体抽出液を得た。得られた清澄液に硫酸アンモニウムを 35% 飽和になるように加え酵素を沈澱せしめた。沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100 ml に溶かし、セロファンチューブで、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に得られた透析液を 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 で平衡化した。DEAE・セルロース 200 ml を充填したカラムに通し、酵素を吸着せしめた。同様の緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液濃度を 0.1 M に上げて NAD(P)-CDH を溶出した。NAD(P)-CDH を含む兩分を集め、これを濃縮後 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して透析した。これを同様の緩衝液で平衡化したヘキシルセファロース 20 ml を充填したカラムに通し、吸着せしめた。このカラムを 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 で洗浄した。次に 0.5 M NaCl を含む同様の緩衝液 200 ml を入れた 500 ml 容坂ロフラスコに植菌し、30°C で 24 時間振盪培養する。この種培養液をコレステロール 5 g/l、グルコース 2 g/l、肉エキス 5 g/l、KH₂PO₄ 5 g/l、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20 ml を入れた 30 ml 容ジャーフーマンターに植菌し、30°C で通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら、72 時間培養した。この培養液を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) 除菌した。得られた培養液に、硫酸アンモニウムを 40% 飽和になるように加え酵素を沈澱せしめた。沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100 ml に溶かし、セロファンチューブで、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 32 ml 得た。全体の活性収率は 32% であった。

液で NAD(P)-CDH を溶出し、活性画分を集め、濃縮し、50 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液 5.0 ml を得た。全体の活性収率は 30% であった。

実施例 2

Alcaligenes sp. № 4 FERM-P№6216 をコレステロール 10 g/l、グリセロール 2 g/l、コーンステープリカー 5 g/l、KH₂PO₄ 5 g/l、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地に培養し、実施例 1 と同様の操作を行ない、40 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 5.0 ml 得た。全体の活性収率は 40% であった。

実施例 3

Proteus vulgaris IAM1025 を用い、実施例 1 に準ずる操作を行ない、37 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液 4 ml を得た。全体の活性収率は 52% であった。

実施例 4

Nocardia sp. № Ch2-1 FERM-P№6217 をグルコース 5 g/l、肉エキス、酵母エキス 0.2 ml、少量の消泡剤の組成よりなる培地 (PH 7.2)

200 ml を入れた 500 ml 容坂ロフラスコに植菌し、30°C で 24 時間振盪培養する。この種培養液をコレステロール 5 g/l、グルコース 2 g/l、肉エキス 5 g/l、KH₂PO₄ 5 g/l、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20 ml を入れた 30 ml 容ジャーフーマンターに植菌し、30°C で通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら、72 時間培養した。この培養液を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) 除菌した。得られた培養液に、硫酸アンモニウムを 40% 飽和になるように加え酵素を沈澱せしめた。沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100 ml に溶かし、セロファンチューブで、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 32 ml 得た。全体の活性収率は 32% であった。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 32 ml 得た。全体の活性収率は 32% であった。

実施例 5

Alcaligenes sp. №4 FERM-P№6216 を用い、実施例 4 に準ずる操作を行ない、25 単位/ｍｌ の NAD(φ)-CDH 溶液を 4.2 ｍｌ を得た。全体の活性収率は 38 % であった。

実施例 6

Proteus vulgaris IAM1025 を用い、実施例 4 に準ずる操作を行ない、18 単位/ｍｌ の NAD(φ)-CDH 溶液を 3.5 ｍｌ 得た。全体の活性収率は 49 % であった。

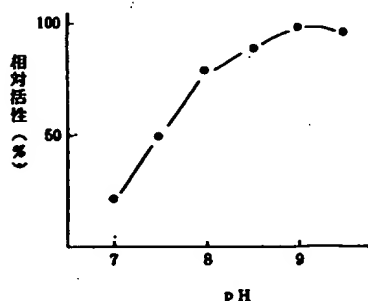
4 図面の簡単な説明

第 1 図はノカルジア sp. № Ch2-1 FERM-P №6217 の生産する NAD(φ)-CDH の 30 °C における至適 PH を示す図であり、第 2 図は本 NAD(φ)-CDH の 37 °C における PH 安定性を示す図であり、第 3 図は本 NAD(φ)-CDH の至適温度を示す図であり、第 4 図は本 NAD(φ)-CDH の熱安定性を示す図である。

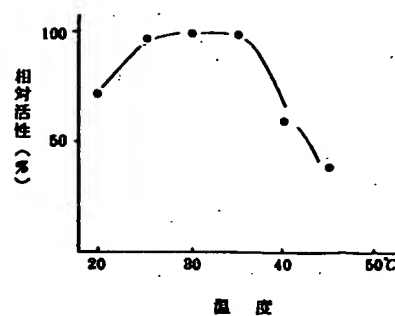
第 5 図はアルカリゲネス sp. № 4 FERM-P № 6216 の生産する NAD(φ)-CDH の 30 °C に

おける至適 PH を示す図であり、第 6 図は本 NAD(φ)-CDH の 37 °C における PH 安定性を示す図であり、第 7 図は本 NAD(φ)-CDH の至適温度を示す図であり、第 8 図は本 NAD(φ)-CDH の熱安定性を示す図である。

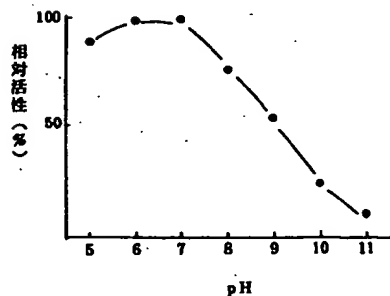
第 1 図



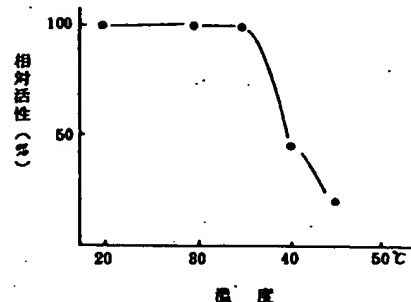
第 8 図



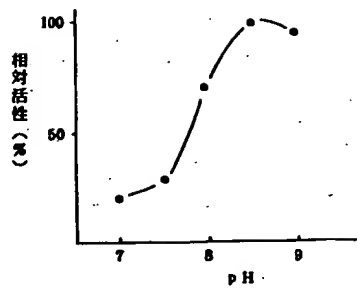
第 2 図



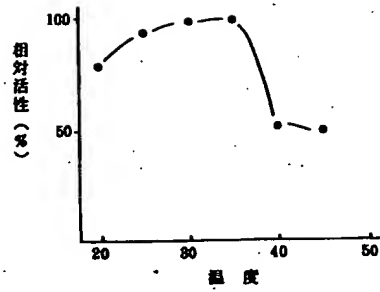
第 4 図



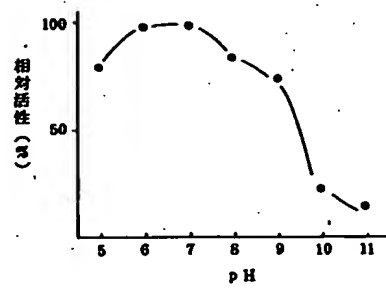
第5図



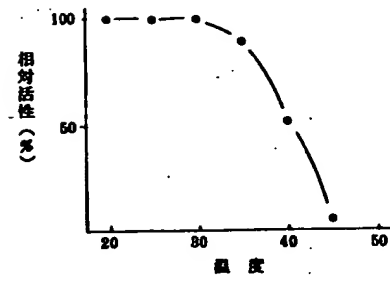
第7図



第6図



第8図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.